



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1754号
学位記番号	第1251号
氏名	堀田 哲也
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	<p>Time-Dependent Changes in Local and Serum Levels of Inflammatory Cytokines as Markers for Incised Wound Aging of Skeletal Muscles (骨格筋切創の受傷時期推定マーカーとしての炎症性サイトカインの局所および血清濃度の時間依存的変化)</p> <p>Tohoku J Exp Med2018; 245(1): 29-35.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 村上 英樹 副査： 山崎 小百合, 植木 孝俊</p>

.....

[目的・背景] 損傷の修復過程におけるサイトカインなどの発現動態は、法病理学的には受傷時期の推定に有用であるが、既報の多くは主として皮膚損傷を検討対象としており、同時に損傷されることの多い骨格筋損傷に関する報告は少ない。本研究では、マウス骨格筋切創モデルを用い、先行研究の DNA マイクロアレイ解析において組織損傷や炎症反応に関連が示されたサイトカインの損傷筋および血清における発現の経時的変動について、マルチプレックス・ビーズ・イムノアッセイを使用して検索する一方、mRNA 発現レベルとの比較・検討を行うことを通じ、受傷後経過時間推定への可能性について検討した。

[試料および方法] 8 週齢の雄性 BALB/c マウスを 5 群に分け（損傷後 6、12、24、48 時間 (h) 群およびコントロール、n = 各 18）、イソフルラン麻酔下で左大腿部の皮膚を切開し、大腿二頭筋に眼科剪刀により長さ 5mm の切創を作成した後皮膚を縫合し、各経過時間後にそれぞれ安楽死させ、切創部分を含めた筋サンプルを摘出した。コントロールには、皮膚を切開し、直ちに摘出した大腿二頭筋を用いた。また、マウスを安楽死させた直後に心臓血約 1.5 mL を採取し、血清を分離した。IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-7、CCL4、CCL2、CCL3、CXCL1、CXCL2、および CXCL10 の 9 種のサイトカインのタンパクおよび mRNA 発現を検討対象とし、前 4 者の遺伝子発現については先行研究の結果を参照した。各群の筋組織を溶解後遠心分離して得た上清、および血清 (n = 各 8) のサイトカイン濃度を MILLIPLEX<sup>®</sup>MAP Kit および MAGPIX<sup>®</sup> System (Merck Millipore) を使用して測定した。なお検出下限値は各サイトカインレベルに応じて 3.4-611 pg / mL とした。また、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) は、摘出筋から RNA 安定化剤に浸漬後ビーズ破砕機にて粉碎し、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて mRNA を抽出し、cDNA に逆転写し、TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems)を用いて行った。イムノアッセイおよび qRT-PCR は各 2 回ずつ行い、その平均値を結果として採用し、Steel-Dwass 検定によりコントロールと各損傷組織サンプル間のサイトカイン発現の統計解析を行った。全ての統計解析で、p < 0.05 を有意水準とした。

[結果] 筋サンプルのイムノアッセイでは、損傷作成後 6h で IL-1 $\beta$ 、IL-6、CCL2、CXCL1、CXCL2、および CXCL10 の 6 種のサイトカインで有意な増加を示し、48h まで維持された。ただし IL-6 および CXCL1 は受傷後 12h で 6h に比して有意に減少した。CCL3 の上昇は、損傷後 12h でのみで見られた。また、IL-7 および CCL4 は、損傷後 48h でのみ有意に増加し、特に IL-7 は損傷後 24h までは検出限界を下回っていた。損傷後 48h での 24h に対する有意な増加は、CCL2 および CXCL2 でも観察された。血清では、6h で有意な増加を示したサイトカインは CXCL1 のみであり、その後 12h でベースラインまで低下した。IL-6 の血清濃度は観察期間を通じ変化せず、他の 7 種のサイトカインでは、損傷後 24h から 48h にかけてわずかに増加するのみであった。損傷筋における mRNA 発現は、IL-7 を除いて損傷後 6h で有意に増加し、48h まで高値を維持した。IL-7 の mRNA 発現は 12h 以降で有意に増加した。

[考察] IL-6 および CXCL1 の筋におけるタンパク発現は受傷後速やかな上昇とそれに引き続く消退が見られ、損傷後早期の応答や修復開始への関与が示唆された。特に CXCL1 のタンパク発現は受傷後 6h で著しく増加し、その後急速に低下した。この変動は血清タンパク濃度および mRNA

発現においても同様に認められたため、CXCL1は筋創傷の受傷後早期の優れたマーカーとなり得ると考えられた。また、IL-1 $\beta$ およびCXCL10の受傷後早期から維持される筋におけるタンパク濃度の上昇は、これらが組織修復に関与することを反映していると考えられた。一方IL-7は筋新生に関与するマイオカインとされ、受傷後24hまでは検出限界以下であり、mRNA発現上昇より若干遅れ48hで有意な発現を認めた。これらの結果から、IL-7は筋創傷の亜急性期のマーカーであることを示している。CCL2、CCL3、CCL4はいずれも筋芽細胞の増殖を誘導するとされ、このうちCCL2およびCCL4で亜急性期における有意な上昇が見られた。今回の検討ではほぼすべてのサイトカインで受傷後早期に増加が見られ、48hまで維持されたが、その中で、特に、CXCL1およびIL-7は、それぞれ初期および亜急性期の受傷後経過時間推定に関する有用な指標となり得ると考えられた。

.....

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 審査論文の要旨

【目的】 損傷の修復過程におけるサイトカインなどの発現動態は、法病理学的には受傷時期の推定に有用であるが、既報の多くは主として皮膚損傷が検討対象であり、同時に損傷されることの多い骨格筋損傷に関する報告は少ない。本研究では、マウス骨格筋切創モデルを用い、先行研究のDNAマイクロアレイ解析において組織損傷や炎症反応に関連が示されたサイトカインの、損傷筋および血清における発現の経時的変動について、マルチプレックス・ビーズ・イムノアッセイを使用して検索する一方、mRNA発現レベルとの比較・検討を行うことで、受傷後経過時間推定への応用の可能性を検討した。

【方法】 8週齢の雄性BALB/cマウスを5群に分け（損傷後6, 12, 24, 48時間（h）群およびコントロール，n = 各18），イソフルラン麻酔下で左大腿部の皮膚を切開し、大腿二頭筋に眼科剪刀により長さ5mmの切創を作成した後皮膚を縫合し、各経過時間後にそれぞれ安楽死させ、切創部分を含めた筋サンプルを摘出し、合わせて心臓血を採取した。コントロールには、皮膚を切開し、直ちに摘出した大腿二頭筋および血液を用いた。IL-1 $\beta$ ，IL-6，IL-7，CCL4，CCL2，CCL3，CXCL1，CXCL2，およびCXCL10の9種のサイトカインのタンパクおよびmRNA発現を検討対象とした。各群の筋組織を溶解後遠心分離して得た上清，および血清（n=各8）のサイトカイン濃度をMILLIPLEX®MAP KitおよびMAGPIX® System（Merck Millipore）を使用して測定した。また、定量的逆転写PCR（qRT-PCR）は、摘出筋をビーズ破砕機にて粉碎し、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit（Qiagen）を用いてmRNAを抽出し、cDNAに逆転写し、TaqMan gene expression assays（Applied Biosystems）を用いて行った。イムノアッセイおよびqRT-PCRは各2回ずつ行い、その平均値を結果として採用し、Steel-Dwass検定によりコントロールと各損傷組織サンプル間のサイトカイン発現の統計解析を行った。全ての統計解析で、p < 0.05を有意水準とした。

【結果】 筋サンプルのイムノアッセイでは、損傷作成後6hでIL-1 $\beta$ ，IL-6，CCL2，CXCL1，CXCL2，およびCXCL10の6種のサイトカインで有意な増加を示し、48hまで維持された。ただしCXCL1は受傷後12hで6hに比して有意に減少した。IL-7は、損傷後24hまでは検出限界を下回り、損傷後48hでのみ有意に増加した。血清では、6hで有意な増加を示したサイトカインはCXCL1のみであり、その後12hでベースラインまで低下した。IL-6の血清濃度は観察期間を通じ変化せず、他の7種のサイトカインでは、損傷後24hから48hにかけてわずかに増加するのみであった。損傷筋におけるmRNA発現は、IL-7を除いて損傷後6hで有意に増加し、48hまで高値を維持した。IL-7のmRNA発現は12h以降で有意に増加した。

【考察】 検討対象としたほぼすべてのサイトカインで受傷後早期に発現増加が見られ、48hまで維持された。その中で、特に、CXCL1は受傷後早期の発現増加とそれに引き続く消退がmRNAおよびタンパク間でよく呼応していること、また IL-7は、受傷後12時間以降におけるmRNAの発現増加とそれに引き続くタンパク発現が特徴的であることから、それぞれ初期および亜急性期の受傷後経過時間推定に関する有用な指標となり得ると考えられた。

### 2. 審査内容の要旨

プレゼンテーション終了後、主査の村上から、死後経過時間のサイトカインへの影響、実験動物に対する処置、鋭的損傷および鈍的損傷でのサイトカイン動態の違い、法医解剖鑑定における今回の研究結果の有用性、研究結果のヒトへの応用の可能性等について計8項目の質問を行った。第1副査の山崎教授からは、鈍的損傷ではなく鋭的損傷を研究対象とした理由、統計処理方法、筋肉損傷に対する皮膚および骨損傷や血腫の影響、実験方法等、計8項目の質問、第2副査の植木教授からは、切創作成部位に大腿二頭筋を用いた理由、受傷後のサイトカイン変動の機序、mRNAとタンパクの動態の類似性について等、計5項目の質問がそれぞれなされた。これらの質問に対し、いずれもおおむね適切な回答が得られ、申請者は学位論文の主旨を十分理解しているとともに、法医病理学を始めとする専攻分野に関する知識を修得しているものと判断された。炎症性サイトカインの発現動態は、受傷時期の推定という法医病理学的観点のほか、創傷治癒過程の解明という点から注目されているが、本研究は、マイクロアレイによる網羅的な検索結果をもとにしつつ、時間特異的な発現を示す分子マーカーを提示し、mRNAとタンパク間の変動の相違も踏まえて検証している点で、価値があるといえる。以上より本論文の著者は博士（医学）の称号を与えるにふさわしい学識を有するものと判断した。

論文審査担当者 主査 村上英樹

副査 山崎小百合，植木孝俊